

大根成分の β -アミラーゼ保護作用及び反應促進作用

中山 莊・渡・辺 美 子

The Protecting and Activating Effects of Heat Stable Component(s) of *Daikon** upon β -Amylase

Shigeru Nakayama and Yoshiko Watanabe

β -アミラーゼがアスコルビン酸によつて阻害されるという事は、Purr 以来、多くの人達によつて研究され、又、この阻害が、酸化剤、還元剤を含む多数の物質によつて恢復される事が知られている⁽¹⁾。

著者等は、大根に含まれるアミラーゼに関する実験⁽²⁾中、その糖化作用が、アスコルビン酸によつて殆んど阻害されない事を見た。然るに西田氏⁽³⁾は、タンニン沈澱法によつて分離、精製した大根アミラーゼが、還元型アスコルビン酸によつて阻害されるが、大根搾汁中のものは阻害されない、と報告している。

著者等の用いた酵素はまだ十分精製されていないので、之がアスコルビン酸で阻害されなかつたのは、不純物として、アミラーゼの阻害を抑制する如き物質を含有する為ではないかと考え、甘藷 β -アミラーゼのアスコルビン酸阻害に対する大根搾汁の抑制作用を検討した所、搾汁中の耐熱性因子がその作用をもつ事を認めた。又、この作用がシステインの作用と類似する事を見た。

他方、 β -アミラーゼの重金属イオンによる阻害に関しては余り文献が見当たらないようで、甘藷 β -アミラーゼは重金属イオンで阻害されない、との記載もある⁽⁴⁾。最近、伊藤、安部両氏及び別所氏は、銅イオンの効果をアスコルビン酸阻害の機構との関聯の下に研究し、重金属イオンの mercaptide 形成による阻害を論じている⁽⁵⁾。

著者等は、甘藷アミラーゼに対する阻害作用を確めた Fe^{+++} 、 Cu^{++} 及び Hg^{++} に対して、上と同様、大根搾汁の効果を調べて、システインと明瞭に傾向を異にする抑制効果を見た。

更に、大根搾汁の加熱濾液はそれ自身、甘藷 β -アミラーゼの作用を促進する事をも認めた。

実 験 法

1. 酵素 甘藷 β -アミラーゼは、Balls 等の方法⁽⁶⁾による“crude paste,”又は“purified paste”を適当な測定値を示す濃度に水に溶解して用いた。

大根アミラーゼは、大根搾汁を 50°C に15分加熱、濾過して得た濾液から3通りの方法で製した(第1表参照)。

2. 大根搾汁加熱濾液(大根濾液、又は濾液) 大根搾汁を 100°C に15分加熱、濾過して得た透

* Japanese sort of radish, *Raphanus sativus* L. var *acanthiformis* MAKINO.

明濾液を用いた。固形分等は測定しなかつた。

3. 酵素作用の測定法 Micro-Bertrand 法によつて還元力の増加を測定した。即ち、酵素液 1.5cc と、M/2 acetate buffer (pH 5) 0.3cc の混合液に、阻害剤、阻害抑制物質及び 5% soluble starch 3.0cc を次々に加え（全容 6.0cc）、40°C で 10 分間反応せしめた後、反応液 2cc 中の還元力の増加を測定し、glucose の mg で表した。

実験結果及び考察

1. 大根アミラーゼの糖化作用に対するアスコルビン酸の作用 大根アミラーゼに対するアスコルビン酸 (A.A.) の効果を、甘藷 β-アミラーゼ及び麦芽チアスターゼと比較してみた所、第 1 表の結果を得た。即ち、甘藷及び麦芽アミラーゼは 10^{-4} mM/cc（以下添加剤の濃度はすべて

第 1 表 諸種 Amylase Preparation に対する A.A. の作用

Enzyme Acti- vity A.A. mM/cc	Radish Acetone Preparation (1)		Radish Tannine Preparation (2)		Radish (NH ₄) ₂ SO ₄ Preparation (3)		Sweet potato β-Amylase (4)		Malt Diastase (5)	
	Glucose mg	%	Glucose mg	%	Glucose mg	%	Glucose mg	%	Glucose mg	%
0	6.63	100	1.90	100	4.55	100	2.17	100	2.38	100
1×10^{-1}	7.79	117	1.87	98	4.58	101	1.46	67	2.11	89
1×10^{-2}	7.05	106	2.00	105	4.55	100	1.15	53	2.10	88
1×10^{-3}	6.33	96	1.95	103	4.25	94	1.20	55	1.30	55

(1) アセトン分別法 (40~60%区分) により調製

(2) タンニン酸沈澱法⁽⁶⁾により調製

(3) 甘藷 crude paste と同じ方法で調製

(4) Balls 等の crude paste

(5) 市販 Diastase

mM/cc で表す) のアスコルビン酸で既に相当阻害され、 10^{-2} mM では約 50% 阻害されるに對し、大根のものは、調製法の如何を問はず、 10^{-2} mM でも約 95% 以上残存する。

2. 甘藷β-アミラーゼのアスコルビン酸阻害に対する大根濾液の効果 甘藷アミラーゼに、アス

第 2 表 甘藷 β-Amylase の A.A. 阻害に対する
大根濾液の効果

Condition of Reaction	Glucose mg	%
1. Enzyme	8.05	100
2. Enzyme + A.A.	0.80	10
3. Enzyme + A.A. + Filtrate	6.71	84
4. Enzyme + Filtrate	8.59	106
5. Filtrate	0	0

Enzyme : crude paste ; A.A. : final concn.

10^{-2} mM; Filtrate : 0.1cc

び B に示す。

濾液の阻害抑制作用は、その添加量と共に増し、遂に酵素の活性は 100% を突破し、その後ほぼ一定の値となる傾向を示す。

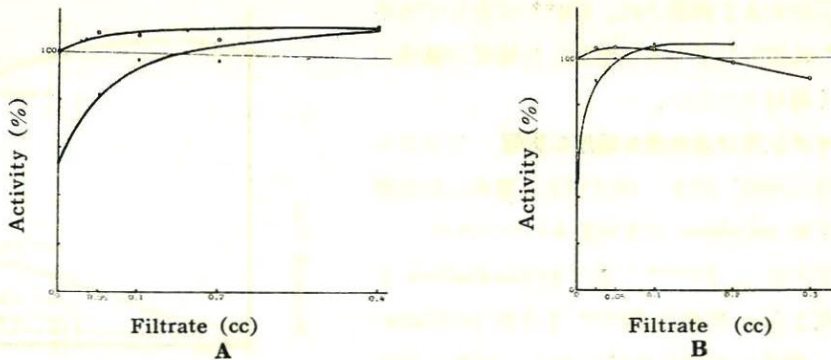
なお、濾液と共存するアスコルビン酸の変化の有無を調べたが、この実験条件では変化の無い事

コルビン酸と共に大根濾液を加えて、アスコルビン酸阻害に対する影響を調べた所、第 2 表の如く、濾液を加えたものは阻害が著しく抑制されていた。

一方、濾液のみを加えたものは（実験番号

4）僅かながら反応が促進されていた。

3. 阻害抑制制度に対する大根濾液添加量の影響 上の実験を更に、濾液添加量を相対的に変えて行つてみた。その結果を第 1 図 A 及



第 1 図 大根濾液の阻害抑制、及び反応促進作用
A : Crude paste; B: purified paste. A.A. 10^{-2} mM; no inhibitor

を確めた。(第 3 表)。

一方、反応促進作用は、第 1 図 A に於てはこの実験条件では、その量に関係なく、ほぼ一定の値を持続するに對し、B では、比較的少量の所に極大が現れ、大量では幾分阻害するに至る。この相異は、濾液中の作用物質の

絶対濃度の差に基くとも想像されるが、季節による大根成分の変化と思われる節もあるので、なお検討を要する点である。A は 9 月、B は 1 月の実験である。

又、A では crude paste を、B では purified paste を使つたという点にも疑問があるが、両者を同一の濾液で比較してみても、相異は全然認められなかつた。

4. アスコルビン酸及び濾液添加順序の影響 以上の実験では、アスコルビン酸、大根濾液及び基質を殆んど同時に酵素液に加えて反応させて来たが、酵素と濾液、酵素とアスコルビン酸及びアスコルビン酸と濾液を予め混合、incubate した後に第 3 のもの及び基質を加えて反応させ、阻害抑制度を比較してみたが、各々の間に殆んど相異を認めなかつた。(第 4 表)。従つて、著者等の実験条件では、添加の順序は実験結果に影響していないとみてよい。

第 4 表 Preincubation の影響

Condition of Preincubation	Activity Glucose mg	%
1. Enzyme	3.50	100
2. Enzyme + A.A.	0.33	9
3. Enzyme + A.A. + Filtrate	2.80	80
4. (Enzyme+A.A.)+Filtrate	2.73	78
5. (Enzyme+Filtrate)+A.A.	2.77	79
6. (A.A.+Filtrate)+Enzyme	2.87	82

Enzyme : crude paste ; A.A. : final concn.
 10^{-2} m M ; Filtrate : 0.05cc. ()内を混合、 40°C 、
15分 preincubate した後、第 3 のものを加え、引続
き基質を加へる

第 3 表 濾液と incubate した A.A. の変化

Filtrate(cc)	0	0.05	0.10	0.15	0.20
A.A.(mg/cc)	1.58	1.66	1.72	1.64	1.66

A.A. と濾液との混合溶液 (6cc) を、 40°C に 10 分間
incubate した後、A.A. 量を 2, 6-dichlorophenol
indophenol 法で測定

5. 甘藷β-アミラーゼの重金属イオン阻害

に対する大根濾液の効果 甘藷β-アミラーゼが Cu^{++} 、 Hg^{++} 及び Fe^{+++} によつて顯著に阻害される事を認めたので、之等の阻害剤に對しても、アスコルビン酸の場合と同様の効果があるかどうかを実験した。結果を第 2 図に示す。阻害剤の濃度は、夫々のイオンの阻害力に差があるので、阻害率が大体等しくなる様に選んだ。

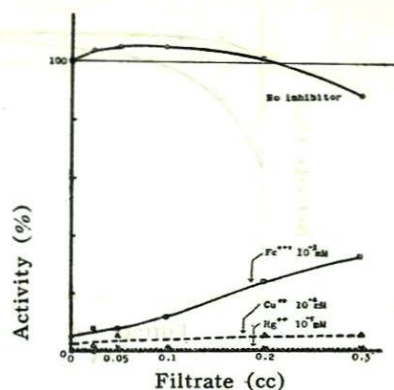
この結果によれば、 Fe^{+++} による阻害は

濾液によつて最もよく抑制され、 Cu^{++} に対しては不明瞭、 Hg^{++} に対してはこゝに添加した程度の濾液によつては全く抑制されない。

6. 金属イオン及び濾液添加順序の影響 アスコルビン酸の場合と同様、酵素、阻害剤及び濾液の添加順序を変えて予め incubate する実験を行つてみた。

第5表に示す如く、 Fe^{+++} に於て preincubation の影響が最も大きく、酵素と Fe^{+++} を予め incubate したものは、濾液の抑制作用最も弱く、酵素と濾液及び濾液と Fe^{+++} のものは抑制作用が最も強い。

Cu^{++} では相異が余り認められない。 Hg^{++} では全体的に抑制作用が弱くて測定誤差も大きいので、結果が明瞭でないが、大体大した影響は無さそうである。



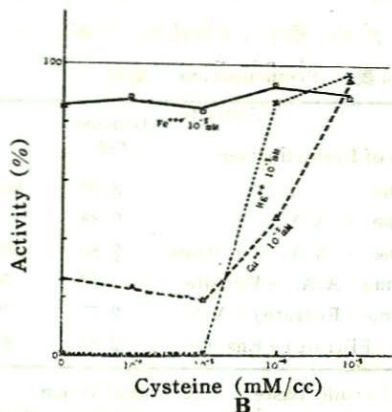
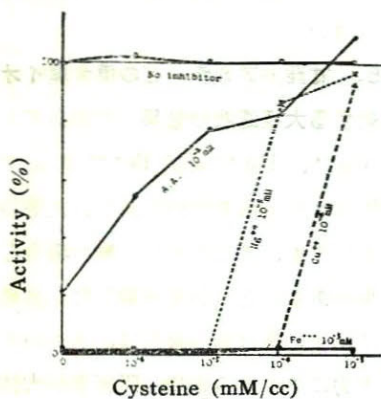
第2図 金属イオン阻害に対する濾液の効果
酵素：purified paste

第5表 金属イオン反応系の Preincubation の影響

Inhibitor	$\text{Fe}^{+++} 10^{-3}$		$\text{Cu}^{++} 10^{-2}$		$\text{Hg}^{++} 10^{-5}$	
	Glucose mg	%	Glucose mg	%	Glucose mg	%
Condition of Preincubation						
1. Enzyme	4.75	100	4.90	100	4.51	100
2. Enzyme + Metal	0.20	4.2	0.22	4.5	0.09	2.0
3. Enzyme + Metal + Filtrate	1.20	25	0.40	8.2	0.20	4.4
4. (Enzyme + Metal) + Filtrate	0.48	10	0.68	14	0.26	5.8
5. (Enzyme + Filtrate) + Metal	3.44	72	0.55	11	0.13	2.9
6. (Metal + Filtrate) + Enzyme	3.76	79	0.72	15	0.08	1.8

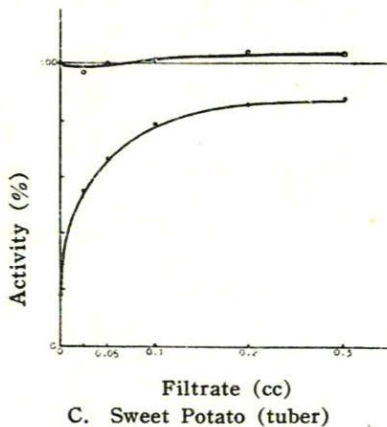
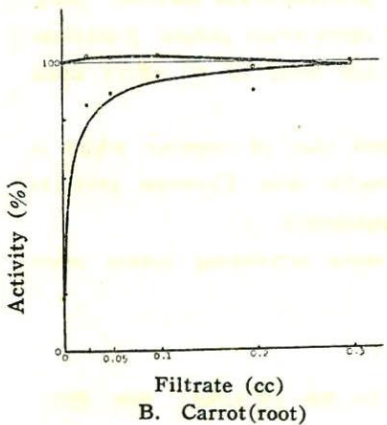
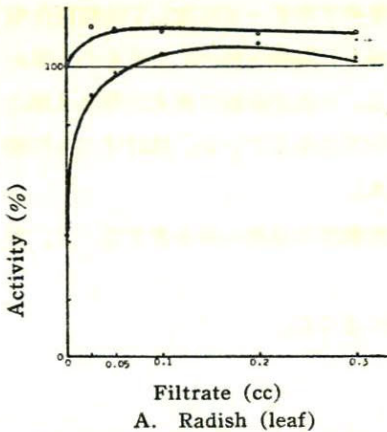
Enzyme：purified paste；Filtrate：0.3cc. Preincubation の条件は第4表参照

以上の実験結果より、大根搾汁中の耐熱性因子が、甘藷 β-アミラーゼのアスコルビン酸及びある種の重金属イオンによる阻害を抑制する事、又、大根搾汁乃至粗酵素液の糖化能がアスコルビン



第3図 システインの阻害抑制作用

酵素：purified paste. B は金属イオンの濃度を等しくしたもの



第4図 搾汁濾液の阻害抑制及び反応促進効果

酵素：crude paste. ●—●, A.A.
10⁻²mM；○—○, no inhibitor

酸によつて阻害されないのは、この因子によつて保護されている為であろうという事が判つた。

然るに、アスコルビン酸によるβ-アミラーゼの阻害は多種類の化合物によつて抑制される事が知られているが、その中、大根濾液の成分として先ず考えられるのはシステイン、グルタチオン等の-SH化合物である。事実、大根濾液は明瞭なニトロプルシド反応を示す。そこで濾液の代りに、システインを用いて阻害抑制効果を調べてみた。(第3図)。即ち、アスコルビン酸Hg⁺⁺及びCu⁺⁺に対して顕著な抑制効果を示すが、Fe⁺⁺に対しては効果が認められない。システインの高濃度(10⁻³mM以上)ではMicro-Bertrand法による還元力の測定が不明瞭になる為、アスコルビン酸-濾液の抑制曲線(第1図)の右半分に相当する部分の比較が不可能であつたが、大体同じ傾向を示す様である(註1)。従つて、アスコルビン酸に関する限りは、濾液の阻害抑制作用に-SH化合物が関与しているという可能性が大きい。併し、果してその他の因子が関与していないかどうか、という事はまだ断定出来ないであろう。併し一方、金属イオンに対しては、はつきりと濾液と逆の効果を示している。

アスコルビン酸のアミラーゼ阻害の機構について、その銅イオンとの關聯性が、前記伊藤、安部両氏、別所氏等によつて論じられているが⁽¹⁾、アスコルビン酸と金属イオンとは、当然そのまゝ比較する事は出来ないであろうし、金属イオン相互の間にも異なる機構がありうる筈である。而して、大根濾液の各種阻害剤に対する抑制作用を概観してみれば、阻害の機構が多様であるのみでなく、阻害抑制物質乃至その抑制機構も亦多様であると考えられないであろうか。今後濾液の阻害抑制物質の検索を、阻害剤の阻害機構との關聯の下に進めてゆくべきものと思う。

次に大根濾液のアミラーゼ促進作用については、植物によつて阻害抑制作用のみあつて、促進作

註1 グラフの横軸を、濾液では添加量(濃度)で表し、システインは濃度の対数で表してあるが、定性的に傾向を比較する事は可能であると思う。

用のないものゝある事（その二、三を第4図A—Cに示す）、麦芽ヂアスターゼに対しては抑制作用のみあつて、促進作用のない事（図表は省略）等から、抑制作用とは別種の因子によるものと思われる。併し抑制曲線に促進曲線が重つている可能性も考えられる。又促進曲線に極大の現れる事のあるもの、之が一種以上の曲線から合成されたものを意味するのではあるまいか。検討すべき問題であると思う。なお、システインには促進作用はない（第3図A）。

終に、本研究に当り御指導を賜つた、大阪大学理学部赤堀二郎教授に感謝の意を表する。又、実験の一部に協力された本学部学生西島勝子嬢に感謝する。

なお、研究費の一部は昭和28年度文部省科学研究助成補助金によつた。

Summary

Filtrate of radish (*daikon*, *Raphanus sativus* L. var. *acanthiformis* MAKINO) juice, heated at 100°C for 15 minutes, has a protecting effect upon sweet potato β-amylase from the inhibition by ascorbic acid and Fe⁺⁺⁺, but it has little or no effect upon Cu⁺⁺ and Hg⁺⁺ inhibition.

Comparisons have been made between these effects and that of cysteine, which is known as a reactivator of β-amylase inhibited by ascorbic acid. Cysteine protects β-amylase from Hg⁺⁺ and Cu⁺⁺, but not from Fe⁺⁺⁺ inhibition.

On the other hand, the filtrate mentioned above has some activating action upon sweet potato β-amylase.

文 献

- 1) 最近の報告として、伊藤、安部、農化 **27**, 486, 762 (1953); **28**, 15, 368, 751 (1954); 別所、農化, **28**, 143 (1954).
- 2) 未発表
- 3) 西田、生化学, **23**, 59 (1951).
- 4) Fischer, Ed.H. et al., Arch. Biochem., **27**, 237 (1950).
- 5) Balls, A.K. et al., **173**, 9 (1948).
- 6) 西田、東京医大, **8**, 113 (1950).